

プリンヌクレオシドの紫外共鳴ラマンバンドの帰属とスペクトル-構造の相関に関する研究

著者	外山 聡
号	408
発行年	1999
URL	http://hdl.handle.net/10097/15277

氏 名 (本籍) と やま あきら
外 山 聡

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 薬 第 4 0 8 号

学位授与年月日 平 成 11 年 11 月 17 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目 プリンヌクレオシドの紫外共鳴ラマンバンドの帰属
とスペクトル構造の相関に関する研究

論文審査委員 (主 査)
教授 竹 内 英 夫 教授 後 藤 順 一

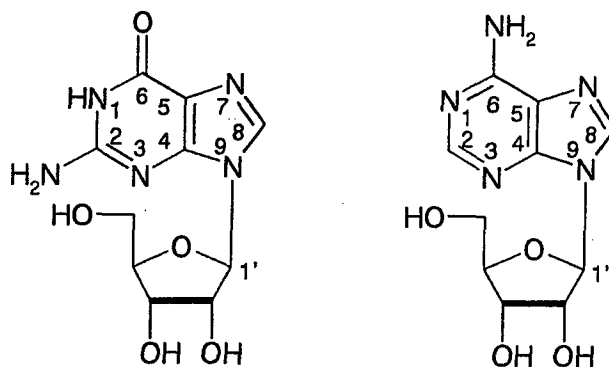
教授 安 齋 順 一

論文内容要旨

はじめに

プリンヌクレオシド誘導体は、核酸の構成成分として重要であるのみならず、エネルギー伝達物質であるアデノシン三リン酸、シグナル伝達に関わるグアノシン三リン酸やアデノシン環状リン酸など、種々の機能を持つものが多い。これら分子の構造と機能の関連を理解するには、機能発現時において、タンパク質など、相互作用する相手の分子に結合した状態における構造（相互作用様式）を解明することが必須である。

振動分光法は、分子構造解析を行うための重要な手法の1つである。特に、紫外共鳴ラマン分光法は、生理的条件下で核酸塩基由来の振動スペクトルを選択的に得ることができるため、ヌクレオシド誘導体の構造研究に有利であると考えられる。一方、振動スペクトルは、潜在的には多くの構造情報を持つが、スペクトルの解釈が単純明快ではないという欠点も有する。振動スペクトルから分子構造の詳細に関する情報を得るには、個々のバンドがどのような振動モードに由来するのかを明らかにし、これを踏まえて、バンド波数・強度と分子構造との相関を解明する必要がある。プリン塩基の振動スペクトルには多くのバンドが現れるものの、大半はその帰属が確立されておらず、また、構造との相関についても系統的な議論は行われていなかった。筆者は、代表的なプリンヌクレオシドであるグアノシンとアデノシン（下図）を取り上げ、それらの紫外共鳴ラマンスペクトルから、ヌクレオシドのコンフォメーションや塩基の水素結合状態を判定できる構造マーカーバンドを見出すことを目的として研究を行った。



Schematic structures of (left) guanosine and (right) adenosine.

第1章 同位元素置換効果に基づいたグアノシン、アデノシンの紫外共鳴ラマンバンドの帰属

個々のラマンバンドが、どのような分子振動に由来するかを明らかにする最善の手段として、同位元素置換シフトを用いる方法がある。特定の原子のみを同位元素置換した分子のスペクトルと未置換体のスペクトルを比較すると、波数変化の観測されたバンドは置換した原子が変位する振動であることが明確にわかる。筆者は、グアノシンについて7種類（2- ^{15}N 置換、2- ^{13}C 置換、6- ^{18}O 置換、7- ^{15}N 置換、8- ^{13}C 置換、9- ^{15}N 置換、1'- ^{13}C 置換）、アデノシンについて3種類（1,3- $^{15}\text{N}_2$ 置換、2- ^{13}C 置換、8- ^{13}C 置換）

の同位元素置換体を合成し、それらの紫外共鳴ラマンスペクトルを測定した。また、帰属の参考とするため、9-イソプロピルグアニン、9-イソプロピルアデニンについて、非経験的量子化学的方法（密度汎関数法）により基準振動計算を行った。

1800–450 cm^{-1} 領域に現れると期待されるプリン環面内振動にほぼ対応して、グアノシンでは27本、アデノシンでは22本のラマンバンドを観測することができた。ラマンバンドの多くは、同位元素置換により有意な波数シフトを示した。これに基づいて、個々のラマンバンドについて振動の実験的帰属を行うことができた。本研究で得た実験結果は、今後より精密な量子化学的計算法を開発する上でも有用な基礎データになると期待される。

第2章 C1'位重水素化シフトによるプリンヌクレオシドにおけるプリン環とリボース環との振動カップリングの検証

立体構造が既知のヌクレオシド関連化合物の振動スペクトルを解析し、コンフォメーションに依存して振動数が変化するバンド、いわゆるコンフォメーションマーカーバンドを検索する研究が行われ、現在、いくつかのマーカーバンドが構造解析に用いられている。しかし、コンフォメーションマーカーの多くは、構造が変化するリボース環由来の振動ではなく、プリン環の面内振動に由来している。プリン環振動がコンフォメーション変化に鋭敏であるのは、プリン環振動とリボース環振動がカップリングしているためと考えられる。しかし、この振動カップリングは、実験的に直接検証されてはいない。プリン環振動のコンフォメーション感受性が、プリン環とリボース環の振動カップリングに由来するの否かを検討するため、リボースのC1'位を重水素化したプリンヌクレオシドの紫外共鳴ラマンスペクトルを測定した。

C1'位の重水素置換に伴い、多くのプリン環面内振動に波数変化が見られた。一般的に、1450–1150 cm^{-1} 領域のバンドは高波数シフトし、1150 cm^{-1} 以下の領域のバンドは低波数シフトした。この波数変化は、1430 cm^{-1} 付近にあるリボース環C1'–H変角振動（ $\alpha(\text{CH})$ と記す）と1050 cm^{-1} 付近の $\alpha(\text{CD})$ との振動カップリングで説明できる。すなわち、1450–1150 cm^{-1} 領域のバンドは、 $\alpha(\text{CH})$ とのカップリングにより本来の波数より押し下げられていたものが、1'-D化により、この押し下げ効果がなくなり高波数シフトする。1150 cm^{-1} 以下の領域のバンドは、 $\alpha(\text{CD})$ とより強くカップルして波数が押し下げられるため、1'-D化により低波数シフトする。1450 cm^{-1} 以上の領域のバンドは、 $\alpha(\text{CH})$ とカップリングしない振動モードである。有意なC1'位重水素化シフトを示すバンドは、コンフォメーションマーカーバンドとして確立されているものか、または、これまでに指摘はなされていないが、コンフォメーション依存性を示す可能性がある。すなわち、いくつかのプリン環面内振動はリボース環振動と強くカップリングしており、プリン環振動のコンフォメーション感受性は、この振動カップリングに由来することが明らかとなった。

第3章 溶媒効果を利用したグアノシン、アデノシンの水素結合状態マーカーバンドの検索

核酸塩基の水素結合状態は、ヌクレオシド誘導体や核酸の構造と機能を理解するために重要である。し

かし、振動スペクトルと水素結合状態の関係については、N-H 伸縮振動や C=O 伸縮振動を除くと、ほとんど調べられていない。スペクトルと水素結合状態との相関を系統的に調べるために、プリンヌクレオシドモデル化合物として、種々の溶媒に溶解するようにリボース水酸基を保護した誘導体、2'-deoxy-3', 5'-bis(triisopropylsilyl) guanosine および 2', 3', 5'-tri-O-acetyl adenosine を用い、これらを水素結合能の異なるいくつかの溶媒（非水素結合性溶媒、水素受容性溶媒、水素受容／供与性溶媒）に溶かして紫外共鳴ラマンスペクトルを測定した。溶媒の水素結合能が同じであれば、溶媒の他の性質（分極率など）が異なっているとしても、非常に良く似たラマンスペクトルを与える。そのため、ラマンバンドの波数、相対強度は、主に水素結合状態に依存することがわかった。

非水素結合性溶媒（1, 2-ジクロロエタンなど）中では、ヌクレオシドは水素結合していない。水素受容性溶媒（テトラヒドロフランなど）中では、塩基の水素供与部位（グアニン環 N1-H, C2-NH₂ 位, アデニン環 C6-NH₂ 位）が溶媒と水素結合する。水素受容／供与性溶媒（メタノールなど）中では、全ての水素結合可能な部位が溶媒と水素結合する。したがって、非水素結合性溶媒中と水素受容性溶媒中のスペクトルを比較することにより、プリン塩基の水素供与部位の状態を反映するラマンバンドを、また、水素受容性溶媒中と水素受容／供与性溶媒中とのスペクトルの比較より、塩基の水素受容部位（グアニン環 N3, C6=O, N7 位, アデニン環 N1, N3, N7 位）の状態に依存するラマンバンドを特定した。さらに、同位元素置換シフトを基にした振動の帰属ならびに非水素結合性溶媒中でのグアニン-シトシン、アデニン-ウラシル塩基対形成を利用して、特定の部位（例えばアデニン環 N1 位）の水素結合状態のみに依存して波数変化を示す水素結合状態マーカーバンドを見いだした。

結 論

グアノシン、アデノシンの紫外共鳴ラマンバンドについて、同位元素置換シフトに基づく振動の帰属を行い、それを踏まえて、ヌクレオシドのコンフォメーションや塩基部位の水素結合状態に依存して波数の変化を起こす構造マーカーバンドの検索を行った。これまでの研究では、コンフォメーションマーカーと水素結合マーカーは個別に取り扱われており、コンフォメーションマーカーバンドに対する水素結合状態の影響や、水素結合状態マーカーに対するコンフォメーションの影響については、ほとんど議論されていなかった。本研究では、リボース環振動とのカップリングの有無と、水素結合状態に依存した波数変化の双方を調査した。1450cm⁻¹ 以上の領域に現れるバンドはコンフォメーション感受性がないため、この領域にある溶媒効果の大きなバンドは良い水素結合状態マーカーとなり、C1' 位重水素化シフトが大きく溶媒効果の小さなバンドは、良いコンフォメーションマーカーになる。すなわち、本研究の結果より、紫外共鳴ラマンスペクトルから、より正確に、コンフォメーションと塩基の水素結合状態を解析できるようになった。本解析方法は、タンパク質に結合したプリンヌクレオチドの構造や、薬物結合に伴う DNA の構造変化の研究などにも適用可能であり、プリンヌクレオシド誘導体について、構造と機能との関連およびタンパク質や薬物との相互作用機構をラマン分光法を用いて解析するための基礎を確立することができた。

審査結果の要旨

プリンヌクレオシド誘導体は、核酸の構成成分として重要であるのみならず、エネルギー伝達物質であるアデノシン三リン酸、シグナル伝達に関わるグアノシン三リン酸やアデノシン環状リン酸など、種々の機能を持つものが多い。プリンヌクレオシド誘導体の構造と機能の関連を理解するには、タンパク質などに結合し、機能を発現している状態での相互作用様式を解明することが必須である。本論文では、アデニン環およびグアニン環の振動について、振動モードおよびコンフォメーションや水素結合状態とスペクトルとの相関関係の解明を行い、紫外共鳴ラマン分光法による相互作用様式の解析を行う上で必須な基礎データを確立した。

先ず、グアノシンについて7種類（2-¹⁵N置換、2-¹³C置換、6-¹⁸O置換、7-¹⁵N置換、8-¹³C置換、9-¹⁵N置換、1'-¹³C置換）、アデノシンについて3種類（1,3-¹⁵N₂置換、2-¹³C置換、8-¹³C置換）の同位元素置換体を合成し、それらの紫外共鳴ラマンスペクトルを測定することにより、グアノシンでは27本、アデノシンでは22本のラマンバンドをプリン環面内振動に帰属することに成功した。また、同位元素置換に伴う波数シフトを基に、個々のラマンバンドについて振動の実験的帰属を行った。

次に、コンフォメーションに依存して振動数が変化するバンドの起源と新たなコンフォメーションマーカの検索を行うため、リボースのC1'位を重水素化した化合物を合成し、紫外共鳴ラマンスペクトルを測定し、詳しく解析した。その結果、プリンヌクレオシドでは、プリン環とリボース環の振動が強くカップリングしており、コンフォメーションの変化に伴うカップリングの強さの変化が、ラマンバンドの波数シフトとして現れることを、初めて実験的に検証した。また、このような検証を行うことにより、新たなコンフォメーションマーカを2個見出した。

さらに、プリン環の水素結合状態を紫外共鳴ラマンスペクトルから決定するための基礎データを得るため、プリンヌクレオシドのモデル化合物を水素結合能の異なるいくつかの溶媒に溶解して紫外共鳴ラマンスペクトルを測定した。系統的なスペクトル解析の結果、アデニン環およびグアニン環の個々の水素結合部位での水素結合状態を鋭敏に反映するラマンバンドを特定した。

以上の研究結果に基づき、プリンヌクレオチドのコンフォメーションと水素結合状態を紫外共鳴ラマン分光法を用いて、詳細かつ正確に解析するための方法を確立することに成功した。この解析法はタンパク質に結合したプリンヌクレオチドの構造解析や薬物結合に伴うDNAの構造変化の解析などに適用可能であり、新規医薬品の分子設計のための基礎データを得る手法として有用である。よって、博士（薬学）の学位論文として合格と認める。